

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 375**

51 Int. Cl.:
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09749747 .3**
96 Fecha de presentación: **13.05.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2285349**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

54 Título: **Nanoemulsiones de perfluorocarbono con superficie de potenciación de endocitosis para transferencia génica**

30 Prioridad:
19.05.2008 EP 08156434

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2012

73 Titular/es:
SOLUVENTIS UG (100.0%)
Im Lottental 36
44801 Bochum, DE

72 Inventor/es:
SCHREIBER, SÖREN

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 375 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanoemulsiones de perfluorocarbono con superficie de potenciación de endocitosis para transferencia génica

La presente invención proporciona nanoemulsiones de perfluorocarbono estables que son adecuadas para transferencia génica, su producción y uso.

5 **Introducción**

Los oligonucleótidos convencionales y más recientemente ARN de interferencia cortos son materiales prometedores y ampliamente usados para transferencia génica. Hasta ahora, las posibilidades para aplicar este material genético a un animal vivo estaban muy limitas.

10 Para la administración de material genético, las emulsiones de perfluorocarbono (PFC) son una herramienta prometedora, ya que estas emulsiones se usan de forma satisfactoria como transportadores de oxígeno (Daugherty, W. P., y col., *Neurosurgery* 54: 1223-1230 (2004); Riess, J. G., *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 33: 47-63 (2005)). A continuación de la aplicación intratecal, las emulsiones de perfluorocarbono convencionales pueden transportar fármacos al pulmón (Dickson, E. W. y col., *Acad. Emerg. Med* 10: 1019-1023 (2003)). Además, las emulsiones de PFC tienen la ventaja de una eliminación segura mediante exhalación (Putyatina, T. K. y col., *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 1281-1285 (1994)).

20 Por lo tanto, los perfluorocarbonos podrían funcionar como una herramienta eficaz y segura para la administración de un material genético a un animal vivo. Debido a su función como transportadores de oxígeno las emulsiones de PFC convencionales tienen tamaños que evitan que salgan del lecho vascular y por lo tanto tales emulsiones no serían capaces de transportar sustancias a células de un organismo vivo.

En los últimos años se han presentado varios sistemas de transporte menos eficaces, por ejemplo, transporte unido a colesterol o mediado por apolipoproteína A en el hígado (Kim, S. I. y col., *A-I. Mol Ther.* 15: 1145-1152 (2007)).

25 El documento EP-B-0788347 divulga la producción de emulsión de fluorocarbono de agua-en-aceite que contiene gotas acuosas de un diámetro promedio de hasta 10 nm. Un agente tensioactivo fluorado o una mezcla de agentes tensioactivos que contienen al menos un agente tensioactivo fluorado se utiliza como un agente emulsificante.

El documento EP-A-1844772 divulga una composición para transfección de células con oligonucleótidos en la que el agente emulsificante es un derivado de imidazolio que tiene cadenas de hidrocarburo o fluorocarbono C₁₀-C₃₆.

30 El documento EP-B-00831770 divulga una microdispersión continua de compuestos fluorados que contiene una fase discontinua que porta el compuesto farmacéuticamente activo. El documento US 2004/0115159 divulga una nanoemulsión de aceite-en-agua que consiste en un sistema ternario de sustancias tensioactivas que es adecuado como un agente de transporte para cosméticos y agentes farmacéuticos. Este sistema ternario comprende un tensioactivo aniónico, uno catiónico y uno anfifílico.

35 El documento US 7.211.248 divulga procedimientos de transfección de células hepáticas con ADN en los que un agente de contraste ultrasónico se complementa con una micropartícula estabilizadora de proteína que porta ADN de plasma. La transfección se logra mediante ultrasonificación de células hepáticas.

El documento US 2007/0184076 divulga una mezcla de nanogotas que consiste en una mezcla oleosa biológicamente aceptable de fluorocarbonos y una sustancia terapéuticamente activa, por ejemplo, un agente anticáncer.

40 El documento US 2006/0013820 divulga una composición que comprende diversos fluorocarbonos, un antígeno que es adecuado como agente terapéutico y opcionalmente vehículos farmacéuticos adicionales. La composición se dice que es adecuada como una vacuna especialmente para tratar VIH.

Los documentos WO 96/40057, WO 96/40053 y EP-A-1306083 divulgan (nano)emulsiones de perfluorocarbono estables como vehículos para sustancias terapéuticamente activas.

45 El documento US 6.071.890 divulga sustancias catiónicas anfifílicas que soportan el transporte de ADN y ARN y compuestos biológicamente activos adicionales dentro del organismo. Estas sustancias están acopladas a esteroides.

El documento WO 01/722812 divulga una micropartícula que comprende un material polimérico, un factor terapéutico biológicamente activo y proteínas lipídicas como agentes de transfección.

Aún se requiere un vehículo de transporte fiable para transferencia génica en un organismo.

50

Sumario de la invención

Ahora se ha observado que una nanoemulsión de perfluorocarbono, en particular una nanoemulsión de perfluorocarbono que tiene fosfolípidos como agentes emulsificantes, que tiene una superficie potenciadora de endocitosis es adecuada para la aplicación de material genético *in vivo*. La adición de moléculas que proporcionan una superficie potenciadora de endocitosis a la nanoemulsión aumenta significativamente la captación de la nanoemulsión de perfluorocarbono en las células. La invención proporciona por tanto

(1) una nanoemulsión de perfluorocarbono estable que tiene una superficie potenciadora de endocitosis, teniendo dicha nanoemulsión una fase de perfluorocarbono continua y una fase acuosa discontinua tamponada y que comprende

- (a) un componente de perfluorocarbono que comprende al menos un compuesto de perfluorocarbono;
 (b) un componente emulsificante; y
 (c) transferrina o un derivado de la misma como un componente de potenciador de endocitosis que induce captación celular de la nanoemulsión a través de endocitosis;

(2) una realización preferida de (1) anteriormente, en la que dicho compuesto potenciador de endocitosis es transferrina;

(3) un agente de transferencia génica o una composición farmacéutica que comprende la nanoemulsión como se define en (1) o (2) anteriormente,

(4) un procedimiento para preparar la nanoemulsión de (1) o (2) anteriormente o el agente de transferencia génica o composición farmacéutica de (3) anteriormente, que comprende las siguientes etapas

- (a) preparar una solución acuosa tamponada que contiene el componente emulsificante,
 (b) añadir el componente de perfluorocarbono, y
 (c) mezclar y homogeneizar mediante un homogeneizador de alta presión el producto de reacción de la etapa (b);

(5) el uso de una nanoemulsión como se define en (1) o (2) anteriormente para preparar un medicamento para transferir material genético a un paciente; y

(6) un procedimiento para transferir compuestos hidrófilos a células *in vitro*, que comprende poner en contacto las células con una nanoemulsión como se define en (1) o (2) anteriormente o con el agente de transferencia génica como se define en (3) anteriormente.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el perfil de temperatura de la unidad de calentamiento y la temperatura corporal media con desviación típica de cinco ratones anestesiados.

La Figura 2 muestra la presión arterial media con desviación típica de cinco ratones anestesiados durante la secuencia de enfriamiento (control).

La Figura 3 muestra la presión arterial media (\pm DT) 6-7 horas después de la aplicación del bloqueante ACE Captopril ($n = 5$, 10 mg/kg de Captopril), puntos grises = valores de control, puntos negros = valores reales).

La Figura 4 muestra la presión arterial media (\pm DT) 24 horas después de la aplicación del nanotransportador con ARNic de angiotensinógeno ($n = 5$, 300 μ l nanotransportador, 60 μ g de ARNic de Agt, superficie: transferrina protegida por Fortecortin), puntos grises = valores de control, puntos negros = valores reales.

La Figura 5 muestra la presión arterial media (\pm DT) 24 horas después de la aplicación de ARNic de angiotensinógeno ($n = 5$, 60 μ g ARNic de Agt) sin nanotransportador inyectado a los dos segundos "Transfección hidrodinámica", puntos grises = valores de control, puntos negros = valores reales.

La Figura 6 muestra la presión arterial media (\pm DT) 24 horas después de la aplicación del ARNic de angiotensinógeno usando un nanotransportador incompleto, la superficie del nanotransportador está sin la proteína potenciadora de endocitosis transferrina ($n = 5$, 300 μ l de nanotransportador, 60 μ g ARNic de Agt, superficie: sin transferrina, adición de Fortecortin) puntos grises = valores de control, puntos negros = valores reales.

La Figura 7 muestra la presión arterial media (\pm DT) 24 horas después de la aplicación de un ARNic no codificante que usa el nanotransportador ($n = 5$, 300 μ l de nanotransportador, 60 μ g de ARNic de Agt, superficie: transferrina protegida por Fortecortin), puntos grises = valores de control, puntos negros = valores reales).

La Figura 8 muestra la presión arterial media (\pm DT) 24 horas después de la aplicación del nanotransportador en solitario ($n = 5$, 300 μ l nanotransportador, 60 μ g ARNic de Agt, superficie: transferrina protegida por Fortecortin), puntos grises = valores de control, puntos negros = valores reales).

Figura 9: Imagen de microscopía electrónica que muestra una partícula del nanotransportador. La partícula tiene un tamaño de aproximadamente 50 nanómetros.

Figura 10: La imagen muestra un hepatocito a un aumento de 46.000 veces. El hígado se explantó 30 minutos después de inyección intravenosa de nanotransportador que contenía ARNic. La flecha marca un

endosoma después de la endocitosis mediada por receptor que contiene una partícula del nanotransportador cargada con ARNic. La membrana y el espacio libre alrededor de la partícula al lado de la superficie celular documentan que la captación ocurre mediante endocitosis mediada por receptor.

Figura 11: Imagen de microscopía electrónica de un hepatocito a un aumento de 50.000 veces. Dos horas después de administración intravenosa de nanotransportador y ARNic se explantó el hígado. Se observan vesículas redondas del nanotransportador que contenían estructuras oscuras sin membranas circundantes. A diferencia de las vesículas del nanotransportador en la imagen de la Figura 10, las partículas no están cubiertas por una membrana. Obviamente, todo el nanotransportador visible se liberó en el citosol.

Figura 12: Detalle aumentado del corte de microscopía electrónica presentado en la Figura 10. A un aumento de 175.000 veces se muestra una partícula del nanotransportador cargado con ARNic liberada en el citoplasma del hepatocito. Las estructuras oscuras dentro de la partícula visible también en las Figuras 10 y 11 corresponden al ARNic incorporado.

Figura 13: Imagen de microscopía electrónica de un hepatocito a un aumento de 50.000 veces. Cuatro horas después de la inyección intravenosa, el animal se sacrificó y se extrajo el hígado. En este punto el nanotransportador ya no contiene las estructuras oscuras visibles en las Figuras 10 a 12. Muy probablemente el ARNic administrado por el nanotransportador se liberó en el citoplasma.

Descripción detallada de la invención

La nanoemulsión de perfluorocarbono estable del aspecto (1) o (2) de la invención (en lo sucesivo en el presente documento denominada de forma abreviada "nanoemulsión de la invención") tiene una fase de perfluorocarbono continua y una fase acuosa discontinua tamponada. Se prefiere que la fase acuosa tamponada corresponda al 25 al 60% p de la nanoemulsión. Los tampones adecuados para la fase acuosa incluyen tampones fosfato tales como dihidrógenofosfato de sodio.

La nanoemulsión de la invención es una nanoemulsión, lo cual significa que la misma tiene un tamaño de partícula de por debajo de 100 nm. Se prefiere que la nanoemulsión de la invención consista en partículas que tengan un tamaño promedio de aproximadamente 50 nm.

La nanoemulsión de la invención se comprende de un componente de perfluorocarbono (a) que comprende al menos un compuesto de perfluorocarbono, un componente emulsificante (b) que comprende preferentemente fosfolípidos como el compuesto emulsificante esencial y que puede comprender además lípidos auxiliares y un componente potenciador de endocitosis (c) que comprende al menos un compuesto que induce captación celular de la nanoemulsión.

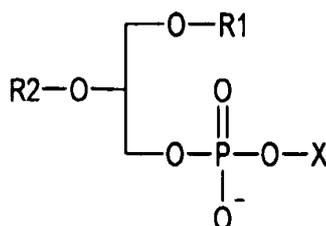
El al menos un compuesto de perfluorocarbono de componente (a) se selecciona preferentemente entre compuestos que tienen la estructura



en la que m es un número entero de 3 a 10, n y o son números enteros de 1 a 5, y X se selecciona independientemente de aparición adicional entre Cl, Br e I.

El componente (a) puede contener una mezcla de dichos compuestos de perfluorocarbono. Los compuestos de perfluorocarbono particularmente preferidos son perfluorooctilbromuro y perfluorotributilamina y mezclas de los mismos.

El componente emulsificante (b) puede comprender una amplia diversidad de compuestos emulsificantes conocidos en la técnica, particularmente aquellos divulgados en las referencias citadas en la introducción. Los compuestos emulsificantes preferidos son fosfolípidos, aún más, como se ha expuesto anteriormente, se prefiere particularmente que los fosfolípidos sean el compuesto emulsificante esencial del componente emulsificante (b). Por tanto, el componente emulsificante (b) comprende preferentemente al menos un compuesto de fosfolípido representado por la fórmula I



en la que R¹ y R² se seleccionan independiente entre H y restos de acilo C₁₆₋₂₄, que pueden estar saturados o insaturados y pueden portar 1 a 3 restos R³ y en la que uno o más de los átomos C se pueden sustituir por O o NR⁴, y X se selecciona entre H, -(CH₂)_p-N(R⁴)₃, -(CH₂)_p-CH(N(R⁴)₃⁺)-COO⁻, -(CH₂)_p-CH(OH)-CH₂OH y -(CH₂(CHOH))_p-

CH₂OH

En la que p es un número entero de 1 a 5;

R³ se selecciona independientemente entre H, alquilo inferior, F, Cl, CN y OH; y

R⁴ se selecciona independiente entre H, CH₃ y CH₂CH₃

5 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En la estructura anterior se prefiere que R¹ y R² se seleccionen independientemente entre H y restos acilo C₁₆₋₂₄ no sustituidos, que pueden estar saturados o insaturados y X se selecciona entre un resto de colina, serina, etanolamina e inositol. Más preferentemente el componente de fosfolípido se selecciona entre fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y mezclas de los mismos.

10 El componente emulsificante (b) puede contener además uno o más lípidos auxiliares seleccionados entre ácidos grasos, esteroides, vitaminas y mezclas de los mismos.

En el componente potenciador de endocitosis (c) dicho al menos un compuesto que induce captación celular se selecciona entre la proteína transportadora de hierro transferrina y derivados de la misma, particularmente holotransferrina humana y derivados de la misma, que se une como la siderotransferrina cargada con hierro a un receptor específico, el cual a su vez induce la endocitosis.

15

Estas proteínas transportadoras se presentan en la superficie del nanotransportador de perfluorocarbono con sustancias variables unidas a la superficie para de esa manera mejorar la endocitosis celular *in vivo* e *in vitro*.

Una nanoemulsión particularmente preferida de la invención comprende perfluorooctilbromuro como componente de perfluorocarbono (a), un componente emulsificante (b) que comprende fosfatidilcolina, esfingomiélin, colesterol, lisofosfatidilcolina, DL- α -tocoferol y fosfatidiletanolamina como fosfolípido y transferrina como el componente potenciador de endocitosis (c).

20

La nanoemulsión de la invención es adecuada para transferencia de compuestos hidrófilos, incluyendo agentes farmacéuticos y material genético, a células diana *in vivo* e *in vitro*, preferentemente la nanoemulsión es adecuada para transferencia de material genético seleccionado entre secuencias de ARN y ADN y combinaciones y derivados de las mismas, preferentemente se selecciona entre todos los tipos de oligonucleótidos, ARNmi, ARNic, ARNbc y similares. La nanoemulsión de la invención es particularmente preferida para transferencia de ARN de interferencia cortos (ARNic), identificar una secuencia complementaria en ARNm y evitar que la misma se traduzca en proteína o cause la escisión del ARNm por el complejo de proteína. Los genes correspondientes se silencian mediante el uso de estos dúplex de ARN, que contienen de 21 a 23 nucleótidos. Cuando se usa ARNic para silenciamiento génico las vías tóxicas para administración y la selección del vehículo son de importancia primordial para obtener concentraciones intracelulares eficaces de ARNic en células y órganos de mamífero vivo intacto.

25
30

El procedimiento del aspecto (4) de la invención para preparar la nanoemulsión de la invención incluye las siguientes etapas

- (a) preparar una solución acuosa tamponada que contiene el componente emulsificante,
- (b) añadir el componente de perfluorocarbono, y
- (c) mezcla posterior, después homogeneización (por ejemplo, mediante ultrasonificación) y finalmente homogeneización de alta presión del producto de reacción de la etapa (b).

35

Para carga de la nanoemulsión con componente potenciador de endocitosis o con el compuesto hidrófilo el procedimiento comprende además una o más de las etapas

- (d) añadir una solución acuosa del componente potenciador de endocitosis y/o el compuesto hidrófilo (particularmente el material genético) para transferencia al producto de reacción de la etapa (c) y homogeneizar (por ejemplo, mediante ultrasonificación) la mezcla resultante.

40

El componente potenciador de endocitosis y el compuesto hidrófilo se pueden añadir en una etapa única (d) o en etapas separadas (d), los mismos también se pueden incluir en la solución acuosa tamponada de la etapa (a).

45 El agente de transferencia génica o composición farmacéutica del aspecto (3) y el medicamento del aspecto (5) de la invención pueden incluir además aditivos y vehículos farmacéuticamente aceptables.

Para explicar el modo de acción y para demostrar la eficacia del nanotransportador se muestra el uso con transferrina como sustancia potenciadora de endocitosis en los siguientes "Ejemplos".

La transferencia génica ilustrativa es la aplicación de un ARNic de angiotensinógeno que provoca una caída marcada de la presión arterial media.

50

La invención se describe con más detalle en los siguientes "Ejemplos", que utilizan transferrina como la sustancia potenciadora de endocitosis y ARN de interferencia corto como material genético.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de un nanotransportador de perfluorocarbono/transferrina:

Para preparación del nanotransportador de perfluorocarbono, perfluorooctilbromuro (Perflubron) se emulsifica con una mezcla de fosfolípidos. Un gramo de la mezcla contiene fosfatidilcolina (980 mg), esfingomielina (10 mg), colesterol (5 mg), lisofosfatidilcolina (5 mg) en agua destilada y tampón de fosfato dihidrógeno de sodio 75 mM (NaH₂PO₄). Para obtener 1000 µl del nanotransportador de perfluorocarbono, se usaron 475 µl de perfluorooctilbromuro, 36 mg de fosfolípido, 200 µl de NaH₂PO₄ 75 mM a pH 7,4 y 325 µl de agua destilada.

En primer lugar, se mezclaron fosfolípidos, tampón de fosfato de hidrógeno de sodio y agua destilada y posteriormente se añadió la solución de perfluorocarbono (PFC). A los 40 segundos, el compuesto se tiene que mezclar mediante un agitador durante 60 s y sin ninguna interrupción homogeneizarse dos veces mediante un dispositivo ultrasónico a una frecuencia de 1100 kHz durante 120 s con intervalos de 30 s. La unidad de sonicación se mantiene a una temperatura de 4°C. Para la emulsión final del PFC de otra forma insoluble, la mezcla se proporciona a un homogeneizador de alta presión. A los seis pases de la homogeneización a 250.000 kPa el compuesto lechoso se vuelve una emulsión transparente azulada. Este cambio a transparencia es un marcador macroscópico de la conversión del tamaño de partícula de perfluorocarbono por debajo de las longitudes de onda visibles. La longitud de onda visible más baja (azul/violeta) de $\lambda = 400$ nm define el tamaño de partícula como $\lambda/2$ cuando la mezcla se vuelve transparente. En este punto se añaden cuatro ciclos adicionales de homogeneización. El tamaño de partícula se midió en un microscopio electrónico como 50 nm (media) estando todas las partículas por debajo de 100 nm. Para obtener el nanotransportador funcional, 4 mg de holotransferrina se disuelven en 60 µl de NaCl estéril al 0,9%. Directamente después de esto, la transferrina se homogeneiza durante 2 s mediante el dispositivo ultrasónico enfriado. La transferrina disuelta se añade a 1000 µl de emulsión de perfluorocarbono para obtener una concentración final de 4 mg/ml. De nuevo, el compuesto se coloca directamente en un agitador durante 30 s.

Ejemplo 2: Transferencia génica

Transferencia génica ilustrativa: Renina es una hormona sintetizada por el riñón que es responsable de una reducción de la presión arterial. La misma transforma en el angiotensinógeno en angiotensina 1, que finalmente se activa mediante enzima convertidora de angiotensina (ACE) en angiotensina 2. La angiotensina 2 es de importancia primordial para la regulación de la presión arterial a mediano plazo. La supresión de la traducción de angiotensinógeno a través de ARNic administrado mediante el nanotransportador podría provocar una depresión de la presión arterial similar a un bloqueante de ACE convencional. Para comparación de los efectos, se trató un grupo de animales con el bloqueante de la enzima convertidora de angiotensina captopril. Esta sustancia soluble en agua pequeña se aplicó como inyección peritoneal. Seis horas después de la inyección, el efecto sobre la presión sanguínea se midió usando un perfil regulado de temperatura definido (véase más adelante).

Adición de ARNic: Se demuestra la transferencia de ARNic en ratones CD1 macho. Para uso en ratones de 35 g, 60 µg de ARNic se disuelven en 30 µl de NaCl isotónico directamente antes de las investigaciones *in vivo*. La solución se añade a 300 µl del nanotransportador y se homogeneiza a 4°C mediante el dispositivo ultrasónico durante 2 s.

Inyección de nanotransportador y material genético en las venas de la cola de ratones: Para anestesia general de inhalación los animales respiraron espontáneamente una mezcla de isoflurano en N₂O al 63%, O₂ al 35% y CO₂ al 2% en un sistema semicerrado.

El compuesto que consiste en ARNic y el nanotransportador se inyectaron en la vena de la cola bajo anestesia general de inhalación. Para asegurar condiciones cardiorrespiratorias estables, los ratones permanecen en un lecho de temperatura regulado y se calentaron mediante una lámpara infrarroja. Durante y a continuación de la inyección se supervisó la frecuencia respiratoria. Directamente después de la inyección intravenosa, la anestesia se detuvo y el animal se recuperó en los próximos dos minutos.

Diferentes secuencias de ARNic de angiotensinógeno se sintetizaron comercialmente y cada una se ensayó en un grupo de cinco animales. Los controles recibieron el nanotransportador completo sin ARNic o sin ARNic no codificante, una inyección de flujo elevado de ARNic o el ARNic en el nanotransportador de PFC sin transferrina.

Dirección de transferencia génica; reducción de presión arterial a continuación de aplicación de ARNic de angiotensinógeno: Para evaluar si la traducción de ARNm de angiotensinógeno se evita satisfactoriamente, se midió el efecto sobre la regulación de la presión arterial durante un perfil de temperatura definido (véase más adelante). Usando un lecho de temperatura regulada, fue posible reducir la temperatura corporal de los ratones, de forma de que el sistema de renina-angiotensinógeno se activa para mantener la presión arterial estable. La inactivación del sistema de renina angiotensinógeno funcional provoca una reducción significativa de la presión arterial claramente visible durante el perfil de temperatura.

Los animales se sometieron a anestesia general de inhalación 24 horas después de que los mismos recibieron los compuestos diferentes descritos mediante inyección intravenosa. El lecho de temperatura regulada se ajustó a 42°C

y por tanto la temperatura corporal de los ratones se mantuvo estable durante los 15 minutos iniciales de la medición y se determinó la presión arterial basal. Después de 15 min se ajustó la temperatura del lecho a 30°C. De ese modo la temperatura del lecho calentado disminuye continuamente, de forma que alcanza 30,5°C treinta min después de que se ha iniciado el perfil de presión arterial. En este punto de tiempo (30 min) la presión arterial se midió nuevamente. Si la temperatura del lecho había llegado a 30°C, entonces se mantuvo a esta temperatura reducida durante 10 min. Durante este periodo de tiempo, la presión arterial se midió 5 min y 10 min después de que la temperatura del lecho había alcanzado 30°C (30 min y 40 min después de haber iniciado el perfil). 10 min después de que la temperatura del lecho alcanzó 30°C la misma se ajustó nuevamente a 42°C. Los siguientes valores de presión arterial se determinaron cuando la temperatura del lecho llega a 41,5°C, es decir 47 min después del punto de inicio del perfil. Por consiguiente, tres valores de presión arterial adicionales se evaluaron en intervalos de cinco minutos, concretamente a 52 min, 57 min y 62 min después de que se inició el perfil de presión arterial. El perfil de temperatura del lecho de calentamiento se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: El perfil de temperatura

Tiempo transcurrido después del inicio del perfil [min]	Temperatura
15	42°C
30	30,5°C
35	30°C
40	30°C
43	41,5°C
47	42°C
52	42°C
57	42°C
62	42°C

Resultados de transferencia génica ilustrativa: Para evaluar si el ARNic de angiotensinógeno se administra satisfactoriamente a las células de un animal vivo, se indujo una reducción de la presión arterial mediante una reducción de la temperatura corporal de los animales usando un lecho de temperatura regulada. El perfil de temperatura provocó una reducción significativa en la temperatura corporal media de los ratones anestesiados de 38°C a 35°C y una recuperación después de recalentamiento del lecho. La Figura 1 muestra la temperatura corporal media a continuación del perfil de temperatura descrito en la unidad de calentamiento.

Para comparación con el efecto de ARNic de angiotensinógeno sobre la presión arterial, se estudió el efecto del perfil de temperatura en animales tratados con el bloqueante de la enzima convertidora de angiotensina captopril, una opción terapéutica común para suprimir el sistema de renina angiotensina en seres humanos. Posteriormente, el efecto del perfil de temperatura se ensayó en animales que recibieron ARNic de angiotensinógeno en el nanotransportador que contenía la nanoemulsión de perfluorocarbono y transferrina o únicamente la nanoemulsión. Los datos se compararon con los valores de presión arterial de animales de control tratados con el nanotransportador, el nanotransportador y ARNic no codificante o ARNic en solitario. El nanotransportador funcional y el ARNic se toleraron bien por los animales. Perfil de presión sanguínea: La Figura 2 muestra la presión arterial media de ratones no tratados.

Perfil de presión arterial en animales tratados con bloqueante de enzima convertidora de angiotensina: Ratones tratados con el bloqueante de la enzima convertidora de angiotensina captopril tienen un sistema de renina angiotensina alterado. Se ensayó el efecto de una temperatura corporal reducida sobre la presión arterial durante un perfil de temperatura definido. Por lo tanto, se documentó una reducción pronunciada de la presión arterial cinco y diez minutos después de que la temperatura del lecho había llegado a 30°C. En estos animales la recuperación a valores de presión sanguínea basal normales ocurrió de forma lenta, de forma que los animales aún tenían presiones arteriales bajas a los 52 min (Figura 3).

Perfil de presión arterial en ratones después de administración de ARNic de angiotensinógeno a través del nanotransportador: Los animales recibieron la secuencia de ARNic de angiotensinógeno CCG GTT CTT GCC ACT GAG AAA (SEC ID N°: 1) administrada por el nanotransportador. Mediante inyección intravenosa se aplicaron 60 µg de ARNic en 300 µl del nanotransportador. Un periodo de incubación de 24 h permitió que el ARNic impidiera la traducción de angiotensinógeno y de ese modo influyera sobre el sistema de renina angiotensina. En comparación con los controles los animales tenían presiones arteriales basales alteradas y una reducción clara de la presión arterial a continuación de la reducción de la temperatura corporal. Además, la presión arterial permaneció a valores bajos para el min 57. Por tanto los valores de presión arterial medidos fueron similares entre animales tratados con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina y los animales que recibieron ARNic de angiotensina administrado a través del nanotransportador. La Figura 4 muestra la reducción de la presión arterial a continuación de la inhibición inducida por ARNic de angiotensinógeno. Perfil de presión arterial en animales de control

5 adicionales: Cuatro grupos de control recibieron el compuesto expuesto en la Tabla 2. En estos grupos de animales como una respuesta a una temperatura corporal reducida la presión arterial estuvo alterada a 35 y 40 minutos. El retorno a valores normales de 37°C a 42°C condujo a un amento rápido de presión arterial nuevamente de forma que los animales tenían valores basales normales desde el min 47 hasta la finalización del perfil. La reducción de presión arterial observada con relación a una temperatura corporal reducida fue ligera y la recuperación a los valores normales basales ocurrió inmediatamente después de que la temperatura había alcanzado nuevamente valores normales, por tanto estos perfiles fueron similares a aquellos de los animales no tratados (estadísticamente no diferentes).

Tabla 2: Procedimientos realizados en grupos de animales de control

Procedimiento	Resultado
Inyección de <u>ARNic de angiotensinógeno sin nanotransportador</u> dentro de 2 s "Transfección hidrodinámica"	Perfil de presión arterial comparable con animales no tratados (Figura 5)
<u>Nanotransportador incompleto</u> Nanotransportador y ARNic sin transferrina potenciadora de endocitosis en la superficie	Perfil de presión arterial comparable con animales no tratados (Figura 6)
<u>ARNic no codificante</u> Nanotransportador con una secuencia de ARNic no codificante	Perfil de presión arterial comparable con animales no tratados (Figura 7)
<u>Únicamente nanotransportador</u> Nanotransportador sin ARNic	Perfil de presión arterial comparable con animales no tratados (Figura 8)

10 Nanoemulsión de perfluorocarbono, no provista de moléculas potenciadoras de endocitosis: Los datos experimentales en una nanoemulsión de perfluorocarbono no dotada con una superficie potenciadora de endocitosis se muestran en la Figura 6 para el uso ilustrativo de ARNic dirigido frente al sistema de renina angiotensina regulador de presión arterial.

15 Los perfiles de presión arterial de animales tratados con nanoemulsión de perfluorocarbono no provista con una superficie potenciadora de endocitosis se compararon con los perfiles de presión arterial de animales de control. Estos datos experimentales demuestran que las nanoemulsiones de perfluorocarbono no provistas de superficie potenciadora de endocitosis no son funcionales para la administración de material genético a las células de animales vivos ya que los perfiles de presión arterial de los animales que reciben esta sustancia eran significativamente no diferentes de los perfiles de presión sanguínea de los controles.

20 Visualización con microscopio electrónico de la administración de ARNic de angiotensinógeno en hepatocitos de ratones: Ratones que pesaban 35 g recibieron inyecciones en la vena de la cola o el nanotransportador cargado con el ARNic de angiotensinógeno. Después de intervalos de 30 minutos, 2 y 4 horas respectivamente, los animales se sacrificaron y el hígado se explantó. El tejido hepático se incrustó en resina epoxi y se obtuvieron cortes delgados por medio de un microtomo. La microscopía electrónica de estos cortes reveló de forma convincente una aparición especial de las nanopartículas incorporadas en las células. La eficacia del nanotransportador para la administración de ARNic a órganos intactos de animales vivos se demostró en imágenes de microscopía electrónica: Dentro de los primeros 30 minutos el nanotransportador se incorporó en endosomas intracelulares a través de captación mediada por receptor. Durante las primeras dos horas después de la inyección, el microtransportador fue dejando el endosoma y se liberó en el citoplasma. A continuación de las siguientes dos horas, estructuras electrodensas del nanotransportador ya no eran visibles, implicando muy probablemente la descarga del ARNic transportado y su liberación al citosol.

25 Las imágenes de microscopía electrónica representadas en las Figuras 9 a 13 muestran la estructura del microtransportador y documentan su captación mediada por receptor, la liberación a partir de los endosomas intracelulares y la descarga del ARNic administrado después de inyección intravenosa en ratones vivos.

30 Las Figuras 10 a 13 muestran imágenes de microscopía electrónica de cortes transversales a partir de tejido hepático de ratones.

Listado de secuencias, texto libre

SEC ID N°: 1 secuencia de ARNic de angiotensinógeno

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Ruhr-Universitaet Bochum

<120> Nanoemulsiones de Perfluorocarbono con Superficie Potenciadora de Endocitosis para Transferencia Génica

<130> 090953wo

<150> EP 08156434.6

<151> 2008-05-19

5 <160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

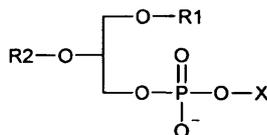
15 <223> ARNic de angiotensinógeno

<400> 1

ccggttcttg ccaactgagaa a 21

REIVINDICACIONES

1. Una nanoemulsión de perfluorocarbono estable que tiene una superficie potenciadora de endocitosis, teniendo dicha nanoemulsión una fase de perfluorocarbono continua y una fase acuosa discontinua tamponada y que comprende
- 5 (a) un componente de perfluorocarbono que comprende al menos un compuesto de perfluorocarbono;
 (b) un componente emulsificante; y
 (c) transferrina o un derivado de la misma como un componente potenciador de endocitosis que induce captación celular de la nanoemulsión a través de endocitosis.
2. La nanoemulsión de la reivindicación 1 en la que
- 10 (i) La nanoemulsión tiene un tamaño de partícula por debajo de 100 nm, preferentemente la nanoemulsión consiste en partículas que tienen el tamaño promedio de aproximadamente 50 nm;
 (ii) dicha fase acuosa tamponada representa del 25 al 60% en peso de la nanoemulsión; y/o
 (iii) el componente potenciador de endocitosis es transferrina.
3. La nanoemulsión de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho al menos un compuesto de perfluorocarbono se selecciona entre $C_mF_{2m+1}X$, $XC_mF_{2m}X$, $XC_nF_{2n}OC_oF_{2o}X$, $N(C_oF_{2o}X)_3$ y $N(C_oF_{2o+1})_3$ (en la que m es un número entero de 3 a 10, n y o son números enteros de 1 a 5 y X se selecciona independientemente de aparición adicional entre Cl, Br e I), preferentemente el perfluorocarbono se selecciona entre perfluorocitilbromuro y perfluorotributilamina y mezclas de los mismos.
4. La nanoemulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho componente emulsificante comprende al menos un fosfolípido como el componente emulsificante esencial y uno o más lípidos auxiliares.
- 20 5. La nanoemulsión de la reivindicación 4, en la que dicho al menos un fosfolípido se selecciona entre compuestos representados por la fórmula I



I

- 25 en la que R^1 y R^2 se seleccionan independiente entre H y restos de acilo C_{16-24} , que pueden estar saturados o insaturados y pueden portar 1 a 3 restos R^3 y en la que uno o más de los átomos C se pueden ser sustituidos por O o NR^4 , y X se selecciona entre H, $-(CH_2)_p-N(R^4)_3^+$, $-(CH_2)_p-CH(N(R^4)_3^+)-COO^-$, $-(CH_2)_p-CH(OH)-CH_2OH$ y $-CH_2(CHOH)_p-CH_2OH$ (en la que p es un número entero de 1 a 5; R^3 se selecciona independientemente entre H, alquilo inferior, F, Cl, CN y OH; y R^4 se selecciona independiente entre H, CH_3 y CH_2CH_3) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, preferentemente R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre H y restos acilo C_{16-24} no sustituidos, que pueden estar saturados o insaturados y X se selecciona entre un resto de colina, serina, etanolamina e inositol.
- 30 6. La nanoemulsión de la reivindicación 5, en la que el componente de fosfolípido se selecciona entre fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y mezclas de los mismos.
- 35 7. La nanoemulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que el lípido auxiliar se selecciona entre ácidos grasos, esteroides, vitaminas y mezclas de los mismos.
8. La nanoemulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende perfluorocitilbromuro como componente de perfluorocarbono (a), un componente emulsificante (b) que comprende fosfatidilcolina, esfingomielina, colesterol y lisofosfatidilcolina, como fosfolípido y transferrina como el componente potenciador de endocitosis (c).
- 40 9. La nanoemulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es adecuada para transferencia de compuestos hidrófilos, incluyendo agentes farmacéuticos y material genético, a células *in vivo* e *in vitro*, preferentemente la nanoemulsión es adecuada para transferencia de material genético seleccionado entre secuencias de ARN y ADN y combinaciones y derivados de las mismas, más preferentemente para transferencia de ARNm_i, ARN_ic o ARN_bc.
- 45 10. Un agente de transferencia génica o una composición farmacéutica que comprende una nanoemulsión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. El agente de transferencia génica o una composición farmacéutica de la reivindicación 10, que comprende además agentes farmacéuticos y material genético a ser transferido a células *in vivo* e *in vitro*, preferentemente el

agente de transferencia génica o composición farmacéutica comprende material genético seleccionado entre secuencias de ARN y ADN y combinaciones y derivados de las mismas más preferentemente comprende ARNmi, ARNic o ARNbc.

- 5 12. Un procedimiento para preparar la nanoemulsión de las reivindicaciones 1 a 9 y el agente de transferencia génica o composición farmacéutica de la reivindicación 10 u 11, procedimiento que comprende las siguientes etapas
- (a) preparar una solución acuosa tamponada que contiene el componente emulsificante,
 - (b) añadir el componente de perfluorocarbono y
 - (c) mezcla, homogeneización de presión alta posterior del producto de reacción de etapa (b).
- 10 13. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende además
- (d) añadir el componente potenciador de endocitosis y/o el compuesto hidrófilo para transferencia al producto de reacción de la etapa (c) y homogeneizar la mezcla resultante.
- 15 14. Un procedimiento para transferir compuestos hidrófilos a células *in vitro*, que comprende poner en contacto las células con una nanoemulsión de las reivindicaciones 1 a 9 o con un agente de transferencia génica de la reivindicación 10 u 11.
- 15 15. Uso de una nanoemulsión de las reivindicaciones 1 a 9 para preparar un medicamento para transferir agentes farmacéuticos y material genético a un paciente.

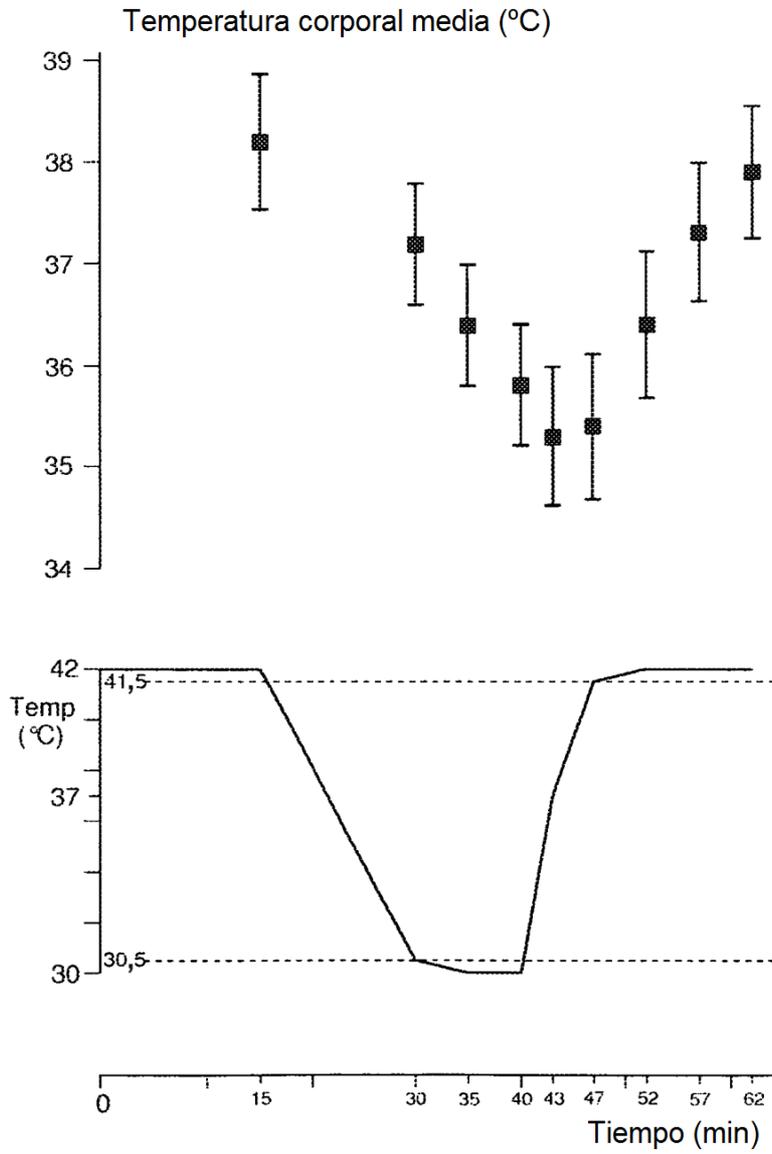


Fig.1

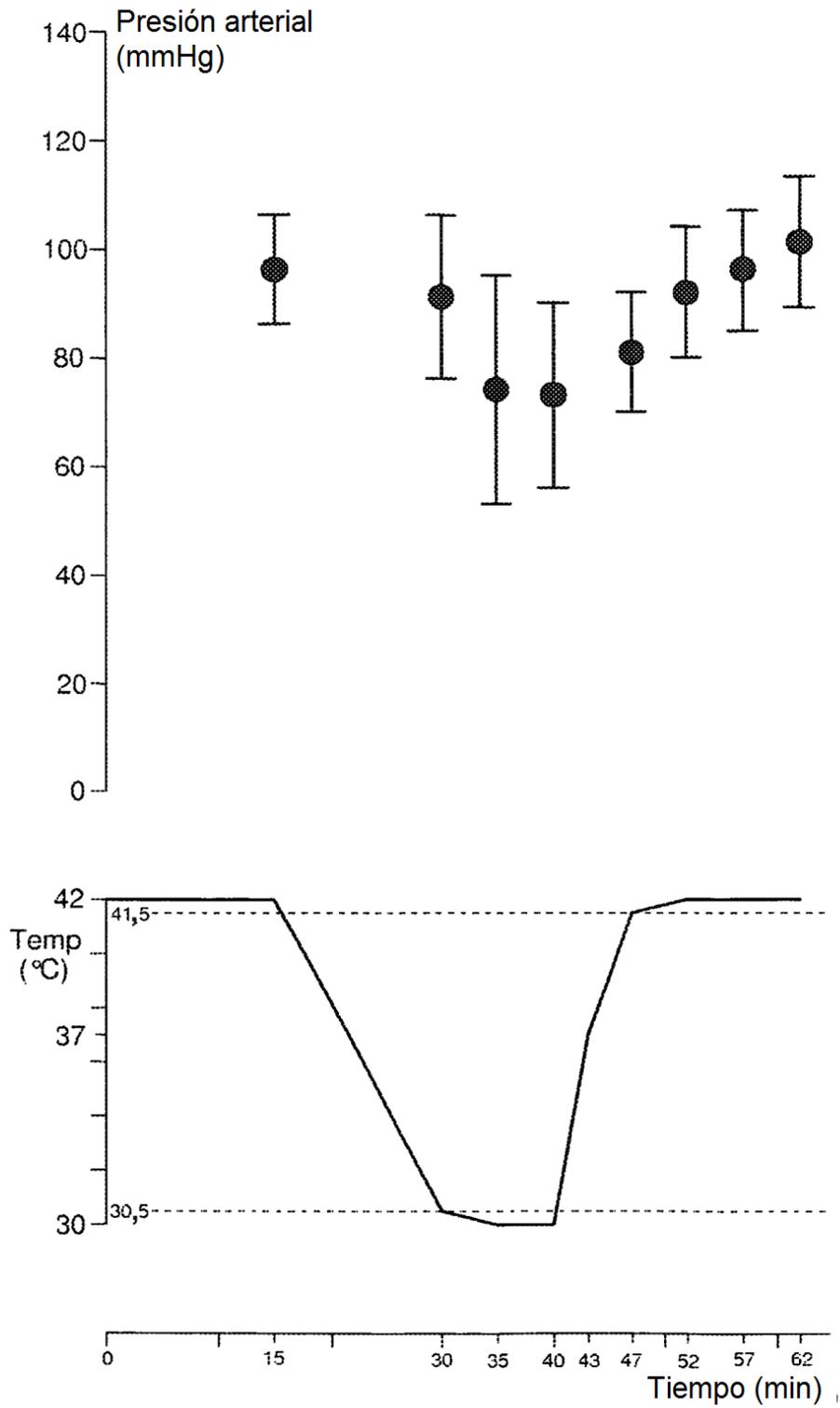


Fig.2

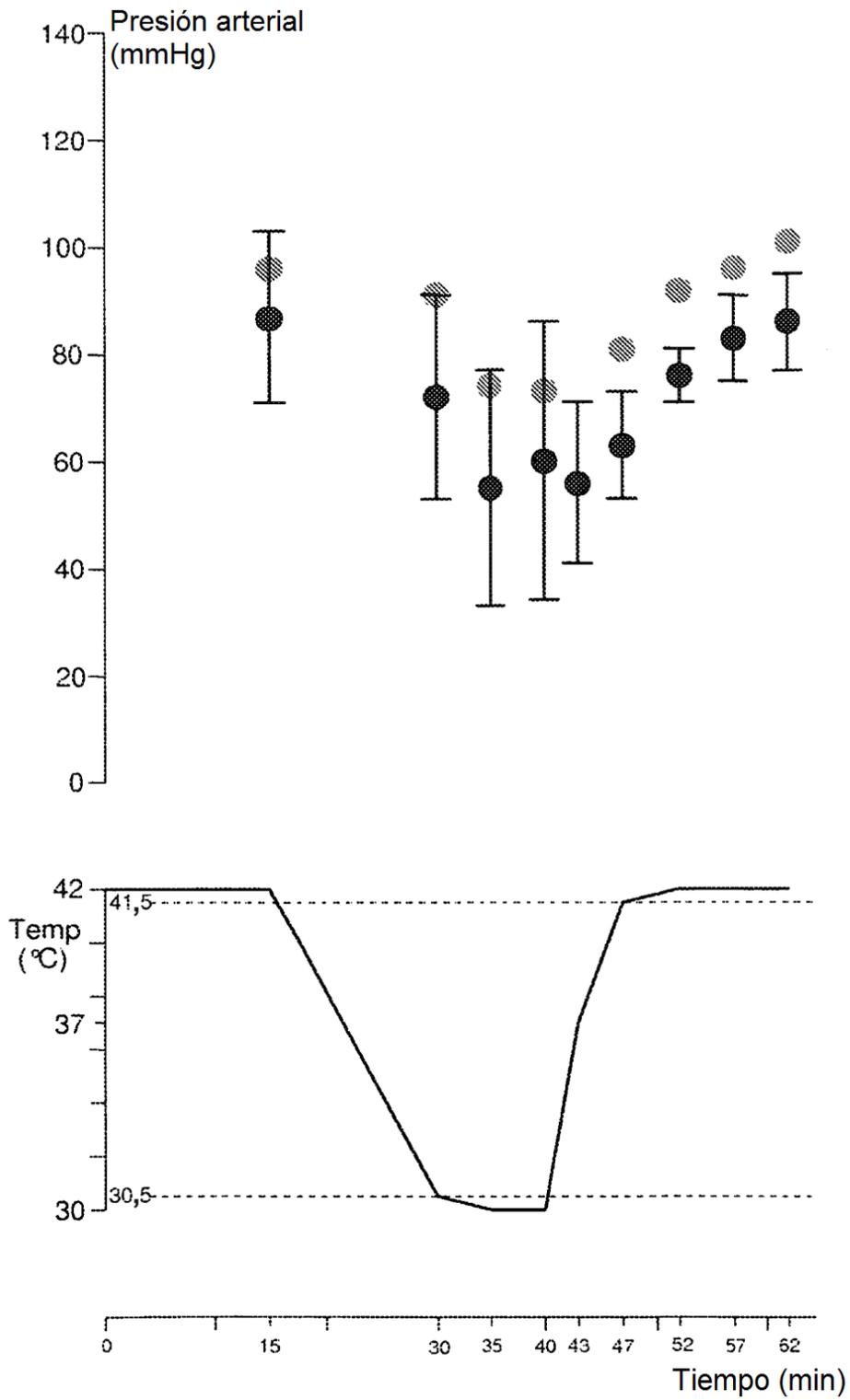


Fig.3

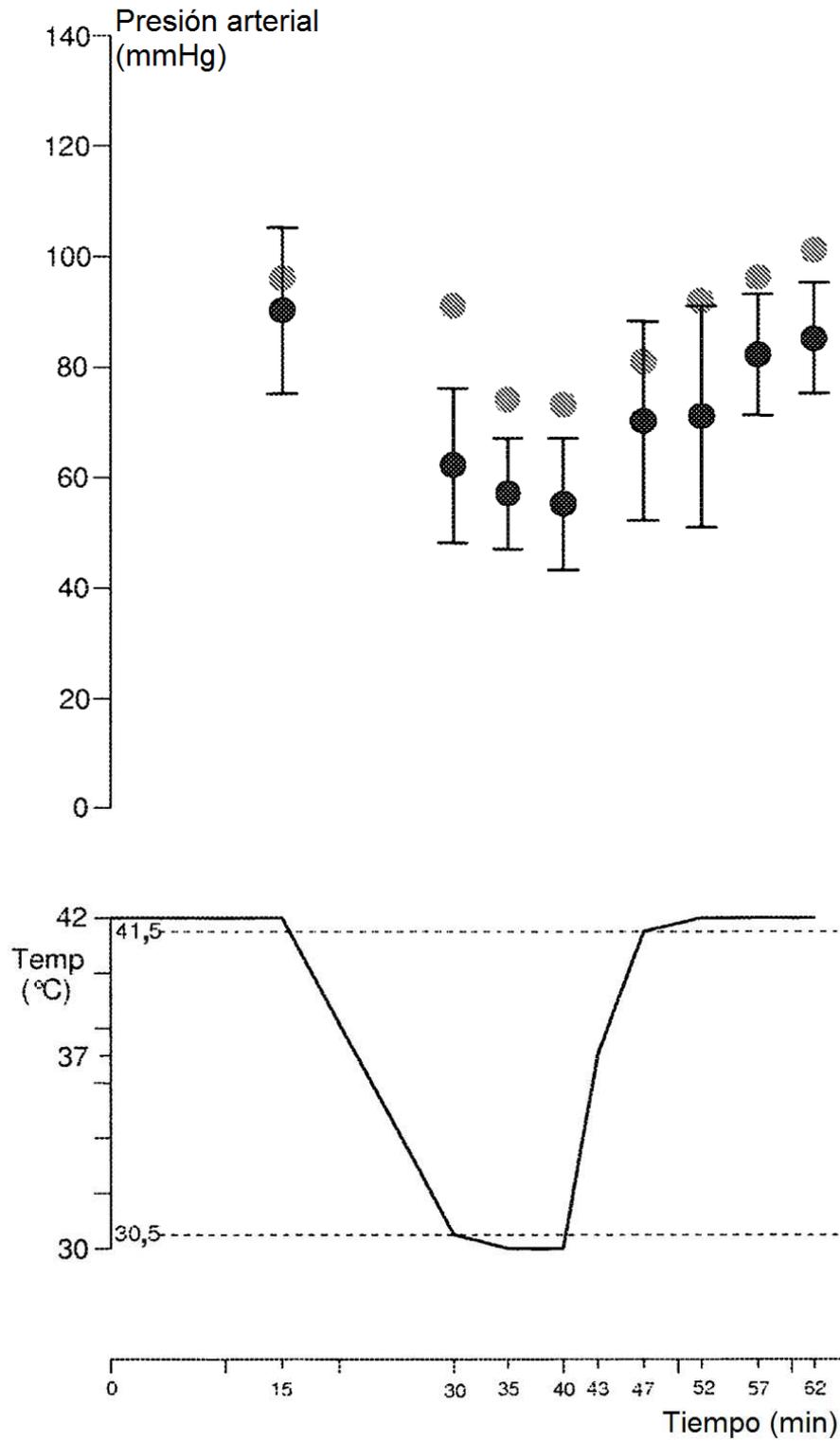


Fig.4

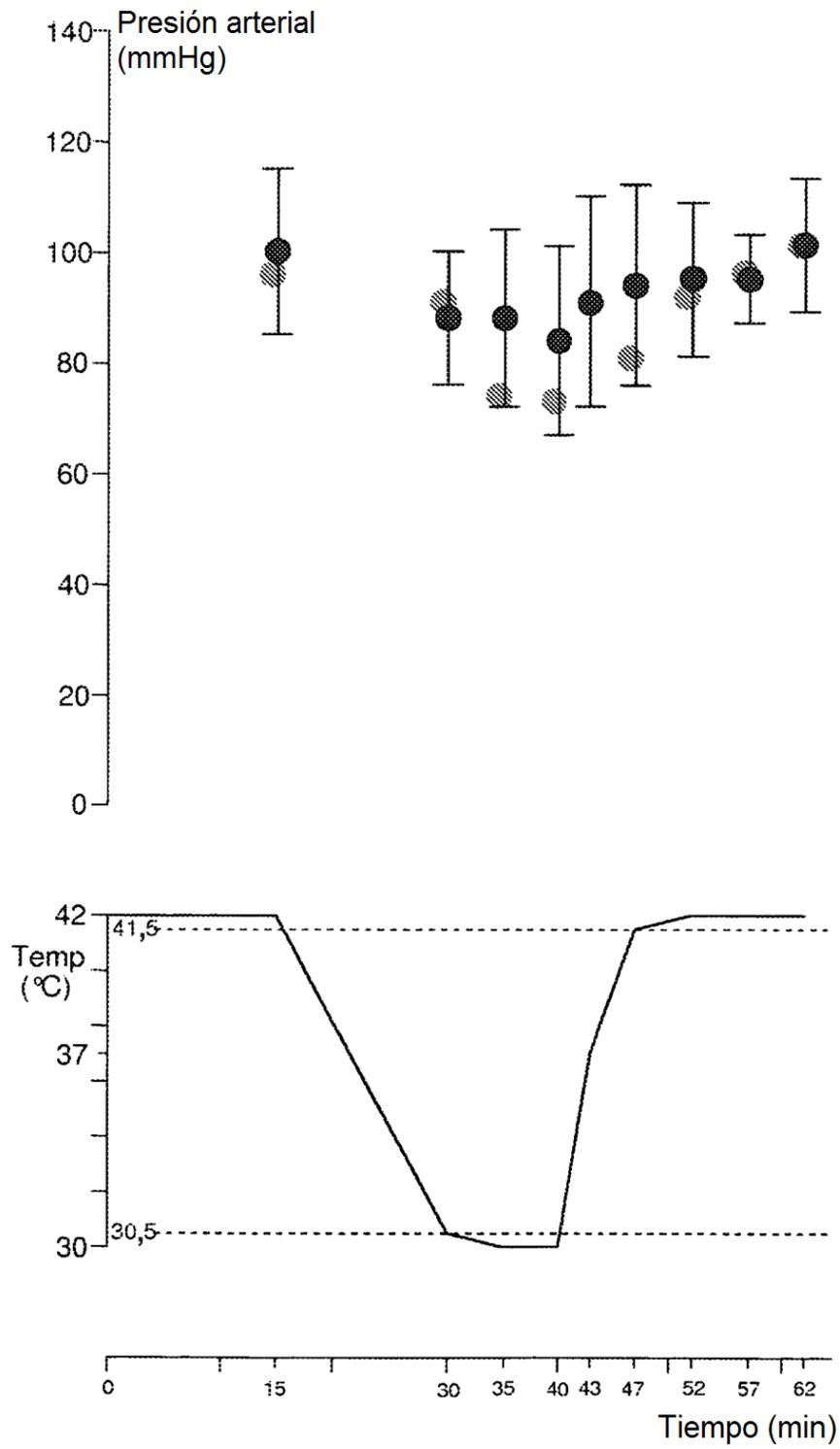


Fig.5

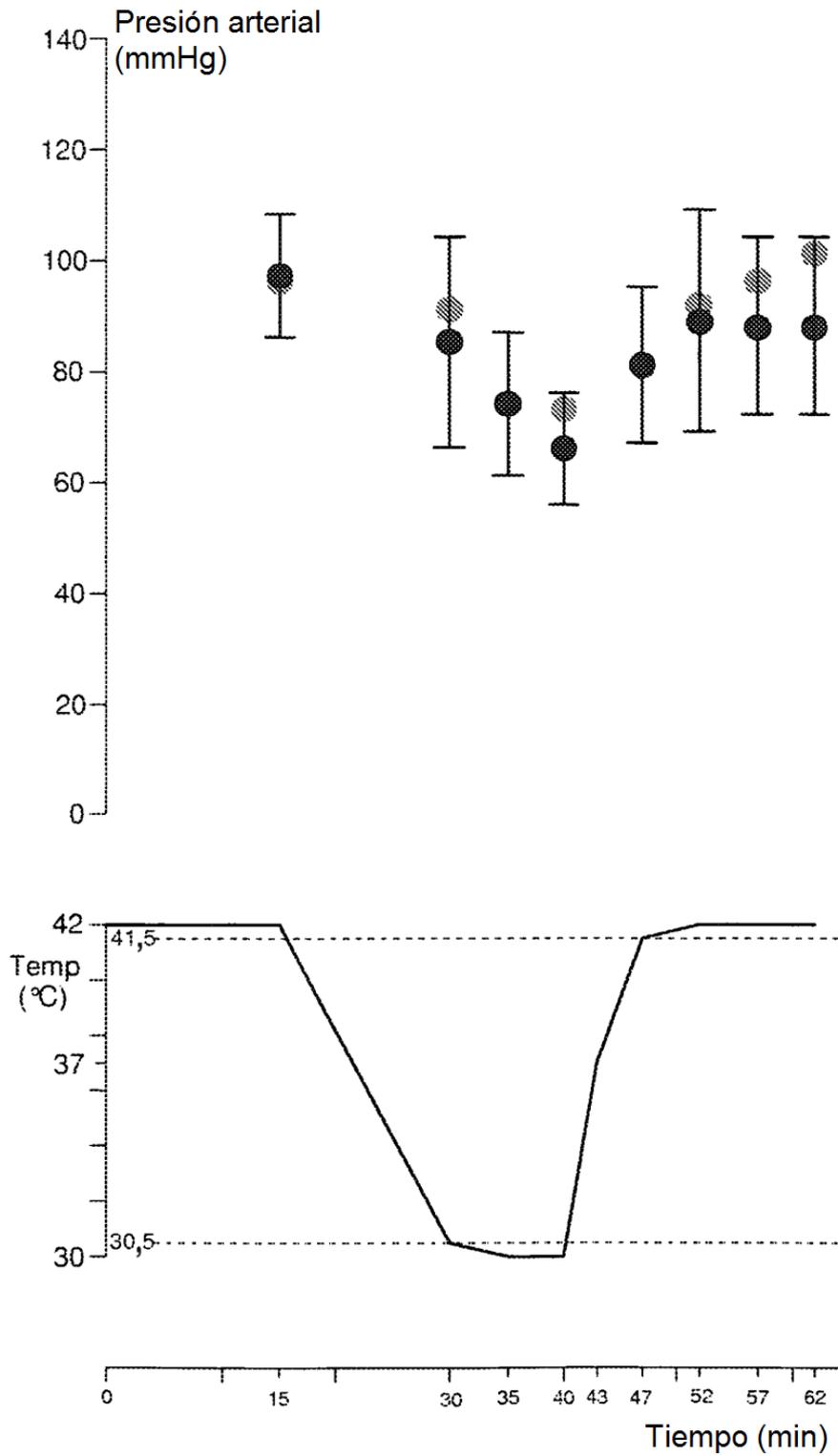


Fig.6

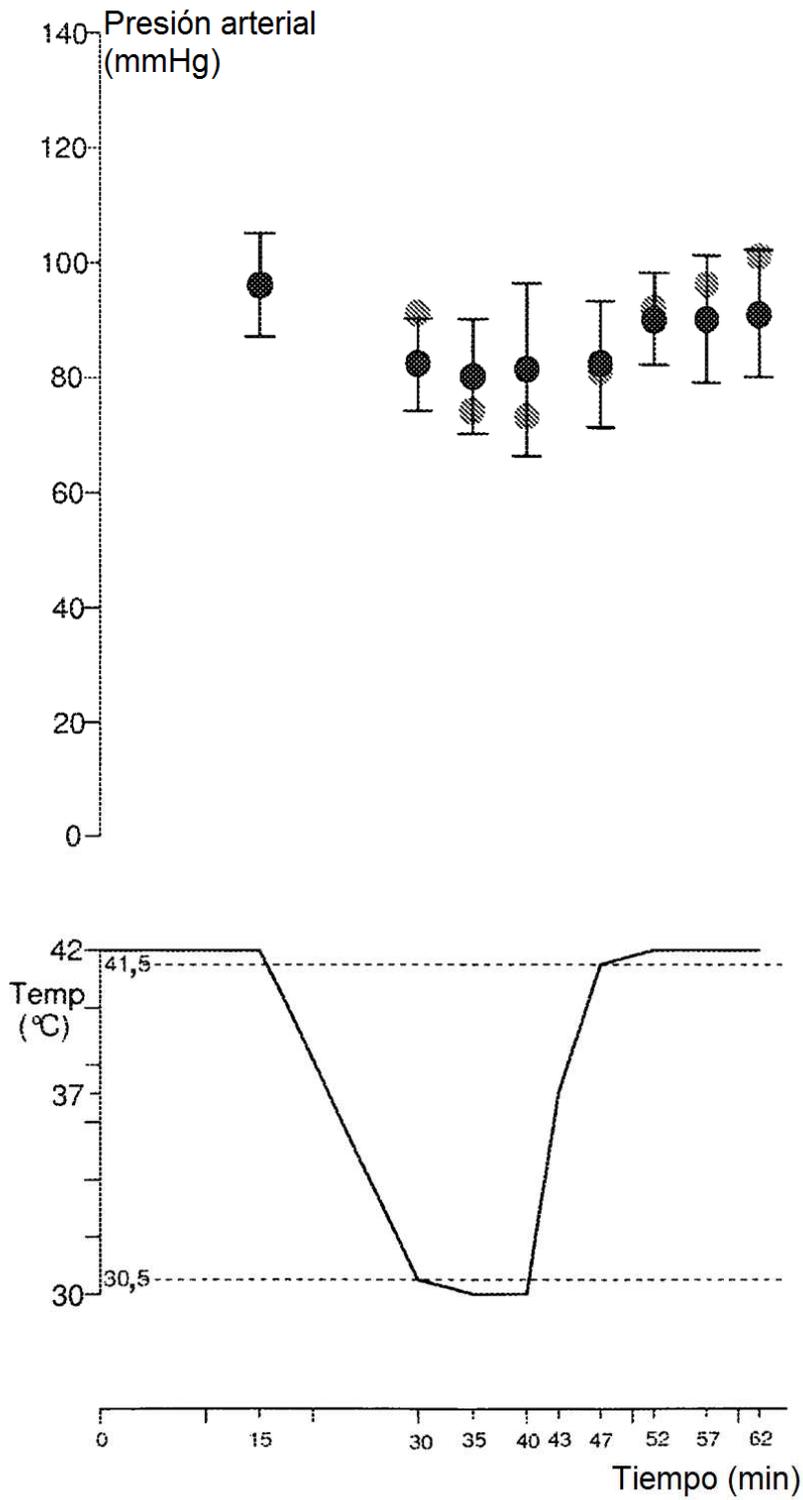


Fig.7

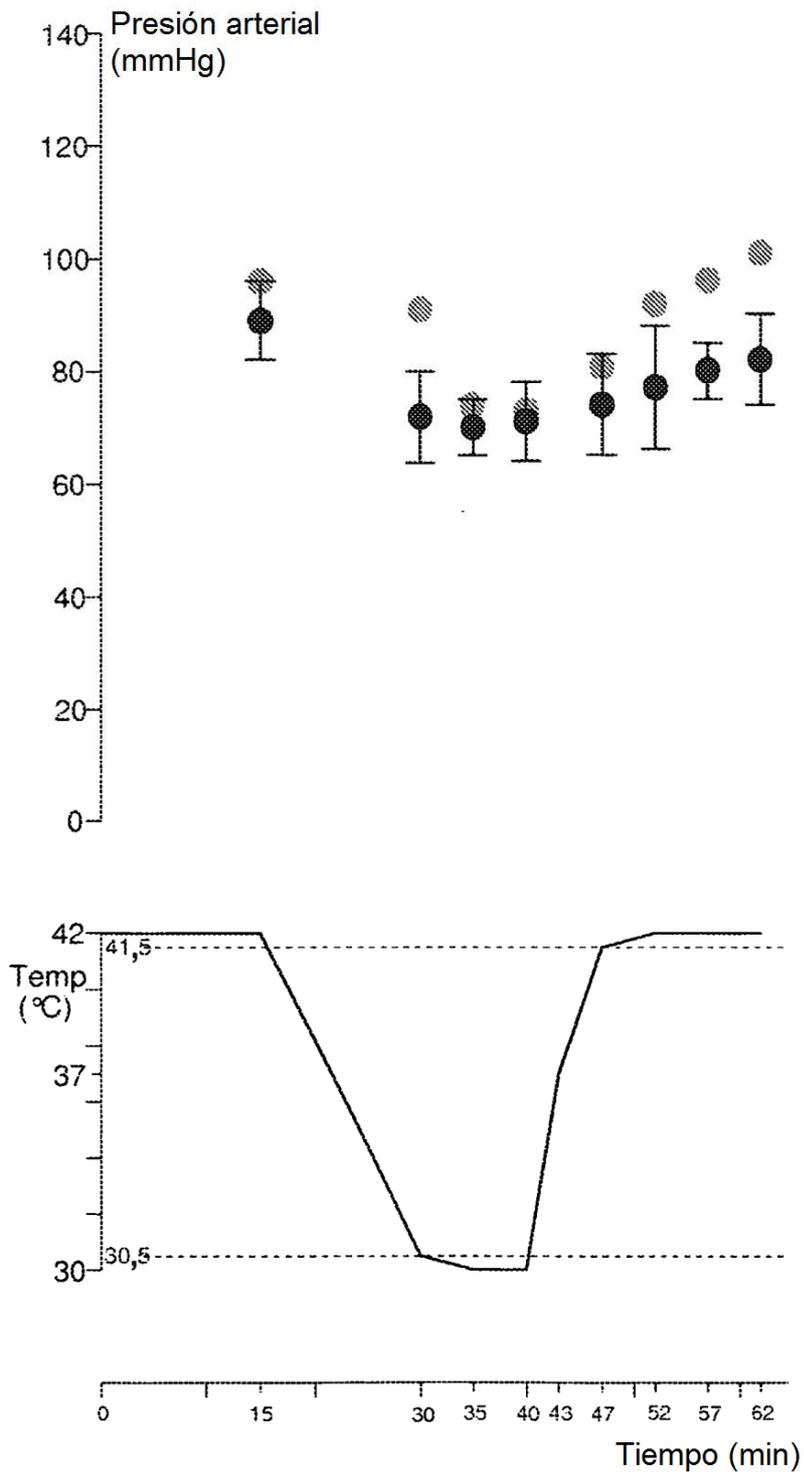


Fig.8

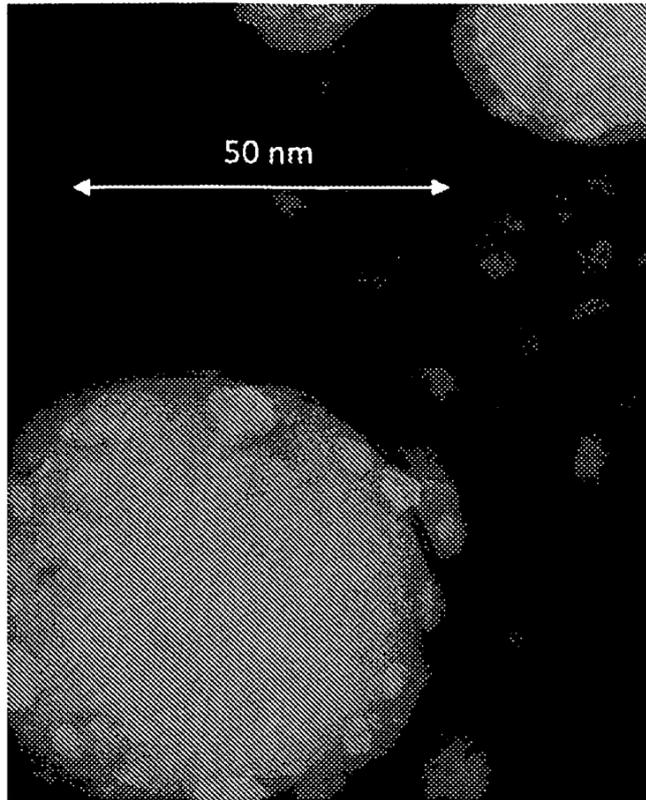


Fig.9



Fig.10

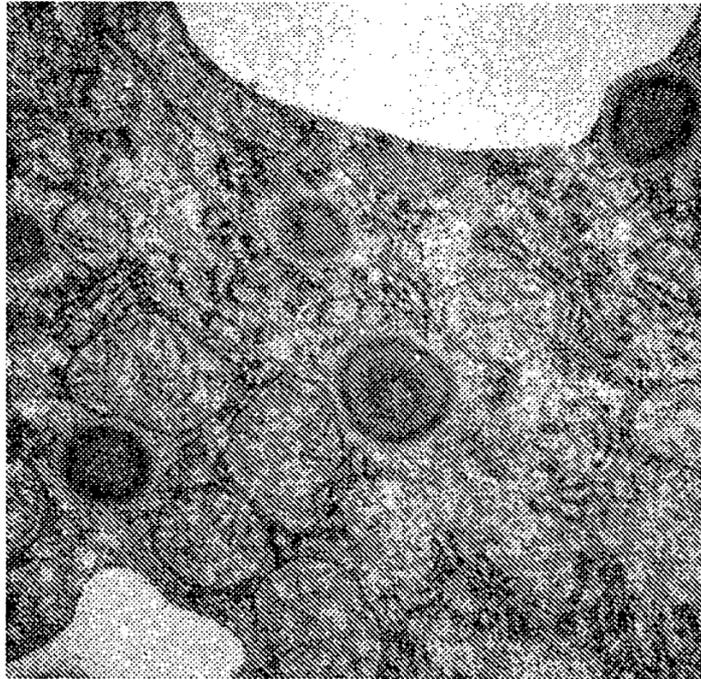


Fig.11

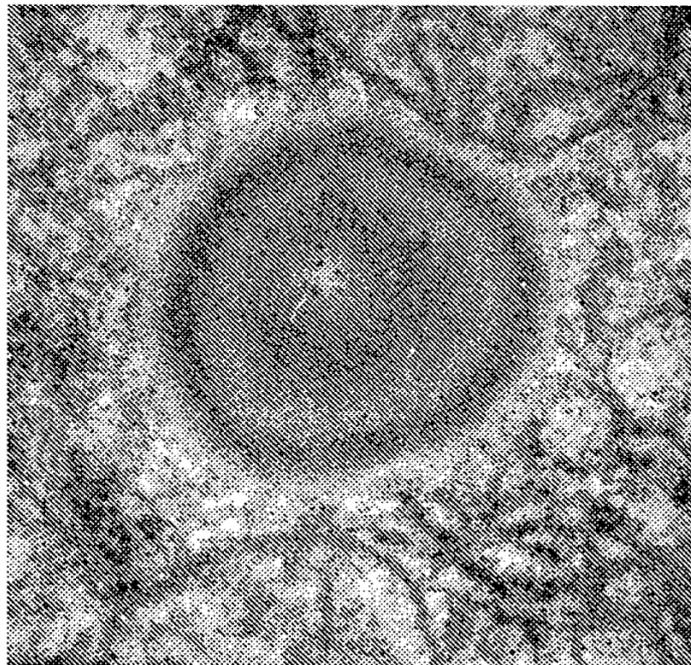


Fig.12

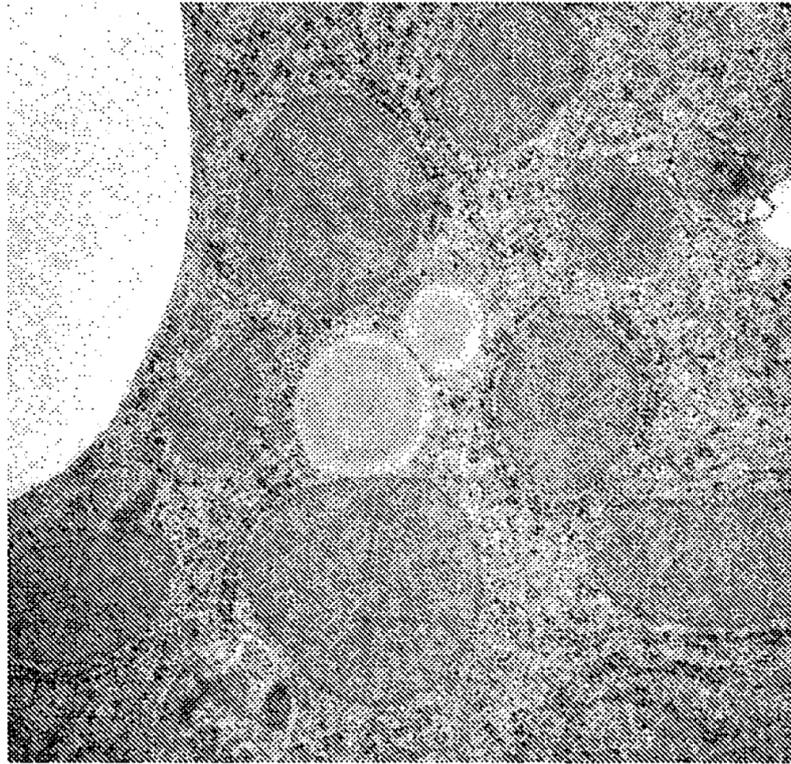


Fig.13